

(5)

Int. Cl. 2:

(9) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

**G 01 N 21/48**

G 01 N 33/16

**DE 28 37 769 A 1**

(11)

## Offenlegungsschrift **28 37 769**

(21)

Aktenzeichen: P 28 37 769.7-52

(22)

Anmeldetag: 30. 8. 78

(23)

Offenlegungstag: 6. 3. 80

(31)

Unionspriorität:

(32) (33) (31)

(54)

Bezeichnung:

Verfahren zur Bestimmung der Konzentration biologischer Substanzen in Mehrkomponentensystemen auf der Grundlage der Spektroskopie der inneren Totalreflexion im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich

(71)

Anmelder:

Müller, Gerhard, Prof. Dr.-Ing., 7080 Aalen

(72)

Erfinder:

gleich Anmelder

---

Prüfungsantrag gem. § 28b PatG ist gestellt

**DE 28 37 769 A 1**

Patentansprüche:

- 1) Verfahren zur Bestimmung der Konzentration biologischer Substanzen in Mehrkomponenten-Systemen auf der Grundlage der Spektroskopie der inneren Totalreflexion im "ultravioletten" und "sichtbaren" Spektralbereich dadurch gekennzeichnet, daß zum Regenerieren einer optisch sauberen Oberfläche des Reflexions-elementes eine transparente, hochbrechende Substanz als aus-wechselbare Zwischenschicht zwischen Reflexionselement (1) und Probe (2) verwendet wird.
- 2) Verfahren nach 1 dadurch gekennzeichnet, daß zur Regeneration der optisch sauberen Oberfläche eine flüssige hochbrechende Zwischenschicht (3) verwendet wird.
- 3) Verfahren nach 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß zur Erlangung einer gleichmäßigen, dünnen Schicht (3) eine dünne Folie mit Öffnung (4) benutzt wird, die auf das Reflexions-element (1) so aufgelegt ist, daß die Reflexionsstellen im Bereich der Öffnung liegen, und daß weiterhin die Flüssigkeit (3) in diese Öffnung eingebracht und gleichmäßig verteilt ist.
- 4) Verfahren nach 1 dadurch gekennzeichnet, daß sich das Reflexionselement (1) in optischem Kontakt (6) mit einem dünnen Objektträger (5) aus dem gleichen oder höher brechendem Material befindet.
- 5) Verfahren nach 1 und 4 dadurch gekennzeichnet, daß der Objektträger (5) mit einer Aufdampfschicht (7) aus hoch-brechendem Material versehen ist.

• 2.

2837769

6) Verfahren nach 1 bis 5

dadurch gekennzeichnet, daß  
als reversible Oberflächenbeschichtung (3) bzw. (4)) beziehungs-  
weise Schicht (5) ein hochbrechender Kunststoff verwendet ist.

7) Verfahren nach 1 bis 6

dadurch gekennzeichnet, daß  
die Schichten bzw. Beschichtungen für jede Messung erneuert  
werden.

030010/0465

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER KONZENTRATION BIOLOGISCHER SUBSTANZEN  
IN MEHRKOMPONENTENSYSTEMEN AUF DER GRUNDLAGE DER SPEKTROSKOPIE DER  
INNEREN TOTALREFLEXION IM "ULTRAVIOLETTEN" UND "SICHTBAREN"  
SPEKTRALBEREICH

Die Erfindung betrifft ein Verfahren auf der Grundlage der Spektroskopie der inneren Totalreflexion zur Bestimmung der Konzentration biologischer Substanzen in Mehrkomponentensystemen durch Auswertung des Absorptionsspektrums im ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Spektralbereich. Ein derartiges Verfahren ist von großem praktischen Interesse, denn es erlaubt Messungen mit geringsten Probenmengen direkt im biologischen Milieu.

Nach dem Stand der Technik ist die Methode der inneren Reflexionspektroskopie ein für den infraroten Spektralbereich unter dem Namen ATR(attenuated total reflection) - Spektroskopie seit längerer Zeit eingeführtes Verfahren /1/. Jedoch war eine Anwendung auf nicht dehydrierte biologische Substanzen praktisch unmöglich, da im IR die Absorption des Wassers stark hinderlich ist.

Einer Anwendung dieser Methode im UV - VIS Spektralbereich stand entgegen, daß erst in den letzten Jahren wasser- und lösungsmittelresistente, hochbrechende Gläser mit ausreichender optischer Qualität erhältlich sind. Aber damit allein ist ein wirtschaftlicher Einsatz des Verfahrens noch nicht gegeben, denn durch Adsorption der Biomoleküle an den Oberflächen sind reproduzierbare Messungen außerordentlich erschwert.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zu Grunde, die bestehenden Mängel und Erschernisse eines solchen Verfahrens zu beheben und damit überhaupt erst eine wirtschaftliche Nutzung zu ermöglichen. Erfindungsgemäß wird dies gelöst durch die Verwendung einer

entweder flüssigen oder festen oder elastischen reversiblen Oberflächenbeschichtung, wie im Folgenden ausgeführt.

Eine Prinzipskizze eines Meßaufbaus für innere Reflexionsspektroskopie ist in Figur 1 dargestellt. Von einer Lichtquelle ausgehend wird ein möglichst gut kollimiertes Lichtbündel erzeugt.

Das Licht durchsetzt dann senkrecht die Eintrittsfläche des Reflexionselementes (1), und wird dann bei geeigneter Wahl des Einfallswinkels  $\theta$  im Inneren des Reflexionselementes (1) total reflektiert. ( Die Anzahl der Reflexionen hängt von der Geometrie des Reflexionselementes ab und sollte dem jeweiligen Meßproblem angepasst sein. Die Auswahl der geeigneten Form eines Reflexionselementes erfolgt nach analogen Gesichtspunkten wie im Infraroten Spektralbereich /1/ ). Die bei Totalreflexion im optisch dünneren Medium -das ist die zu untersuchende Substanz- (2) auftretende quergedämpfte Lichtwelle wird nun von diesem Medium beeinflusst und damit ändert sich die spektrale Zusammensetzung des eingestrahlten Lichtes. Diese Änderung wird als Absorptionsspektrum dann wie üblich registriert, also z.B. mit Spektrometer, Photodetektor, Verstärker und Schreiber, und anschließend geeignet ausgewertet.

Im UV - VIS Spektralbereich liegt die Eindringtiefe der quergedämpften Lichtwelle in einem Bereich von etwa 0,05 bis 0,5  $\mu$  und da weiterhin die Feldstärke der Lichtwelle mit zunehmender Eindringtiefe exponentiell abfällt, ist die Erzeugung und Wiederherstellung sauberer und reproduzierbarer Oberflächen von grundlegender Bedeutung.

Erfingungsgemäß wird dies durch Aufbringen einer auswechselbaren Oberflächenschicht erreicht. Da die Eindringtiefe von dem Unterschied des Brechungsindexes (BI)  $n$  der Probe (2) und des Reflexions-

elementes (RE) (1) abhängt ist ein möglichst hoher BI des RE (1) und somit auch der Oberflächenbeschichtungen (3,5,6,7) notwendig. Hierfür kommen eine Reihe von Substanzen in Frage und zwar sowohl feste wie flüssige. Demzufolge gibt es auch mehrere verschiedene Möglichkeiten eine reversible Oberflächenschicht herbeizuführen.

1) Flüssigbeschichtung (s.a. Figur 2)

Auf die Oberfläche des RE (1) wird eine Maske mit zentraler Öffnung (4) aufgelegt. In die Öffnung wird eine geringe Menge der hochbrechenden Flüssigkeit (3) getropft und mit einem Spatel oder ähnlich glatt gezogen, sodaß vermittels der Haftung durch Randspannung eine Flüssigkeitsschicht in gleicher Dicke, wie die der umgebenden Maske erreicht wird. Die Schichtdicke sollte äußerst gering sein. Sodann wird die Probe (2) überschichtet. (Daran anschließend kann das ATR-Spektrum gemessen werden). Man muß daher von der hochbrechenden Flüssigkeit (3) fordern, daß sie sich nicht mit der Probe mischen oder eine störende chemische Verbindung eingehen darf. Nach der Messung werden Maske (4) und hochbrechende Flüssigkeit (3) vom RE (1) abgewischt; eine neue Maske wird aufgelegt, mit der Flüssigkeit gefüllt .. usw.

Als hochbrechende Flüssigkeiten kommen in Frage:

- a) Immersionsöle wie z.B.  $\text{Br}_4(\text{CH})_2$  od.  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{Br}$  etc.
- b) Polymere wie Polyvinylcarbazol etc.
- c) Harze

2) Feste Beschichtung (s.a. Figur 3 und 4)

a) einfache Schicht (Fig. 3)

Ein dünner transparenter Objektträger<sup>(5)</sup> aus einem hochbrechenden Material wird mittels einer geeigneten Immersionsflüssigkeit (6) in optischen Kontakt mit der Oberfläche des RE (1) gebracht. Im einfachsten Fall besteht das Plättchen (5) aus dem gleichen Material wie das RE (1). Es kann jedoch auch aus einem anderen geeigneten Material mit hohem BI sein - z.B. aus einem Polymer, das einen wesentlich höheren als unter 1b geforderten Polymerisationsgrad hat und somit fest ist. -

b) Mehrfachschicht (Fig. 4)

Um an der Grenzfläche zur Probe (2) einen noch höheren BI zu erreichen, kann man das unter 2a erwähnte Plättchen (5) auch noch mit einer hochbrechenden Aufdampfschicht (7) versehen (z.B. ZnS oder TiO<sub>2</sub>). Das Plättchen (5) selbst ist dann wieder vermittels einer Immersionsflüssigkeit (6) im optischen Kontakt mit dem RE(1).

Bei beiden Methoden 2a und 2b sind die Objektträger (5) ähnlich wie unter 1 Einwegartikel.

Neben dem Vorteil einer regenerierbaren Oberfläche hat das beschriebene Verfahren einen weiteren Vorzug. Bei geeigneter Auswahl der Beschichtung ist es möglich die Adsorption bestimmter Substanzen aus der Probe zu provozieren und somit eine erhöhte Nachweisempfindlichkeit zu erreichen.

Die Auswertung der so gewonnenen Spektren kann dann nach dem Stand

der Technik erfolgen. Es sei darauf hingewiesen, daß es für eine Vielzahl von Problemstellungen nicht notwendig ist einen Kontinuumstrahler als Lichtquelle zu verwenden, sondern daß mit Vorteil Mehr-Linien-Strahler (Spektrallampen) Verwendung finden können; dann nämlich, wenn es ausreicht die relativen Absorptionen an mehreren Stellen im Spektrum zu messen.

Literatur:

/1/ N.J. Harrick  
" Internal Reflection Spectroscopy "  
New York, 1967, Verlag John Wiley & Sons, Inc.

2837769

- M -

Nummer:  
Int. Cl.2:  
Anmeldetag:  
Offenlegungstag:

28 37 769  
G 01 N 21/48  
30. August 1978  
6. März 1980

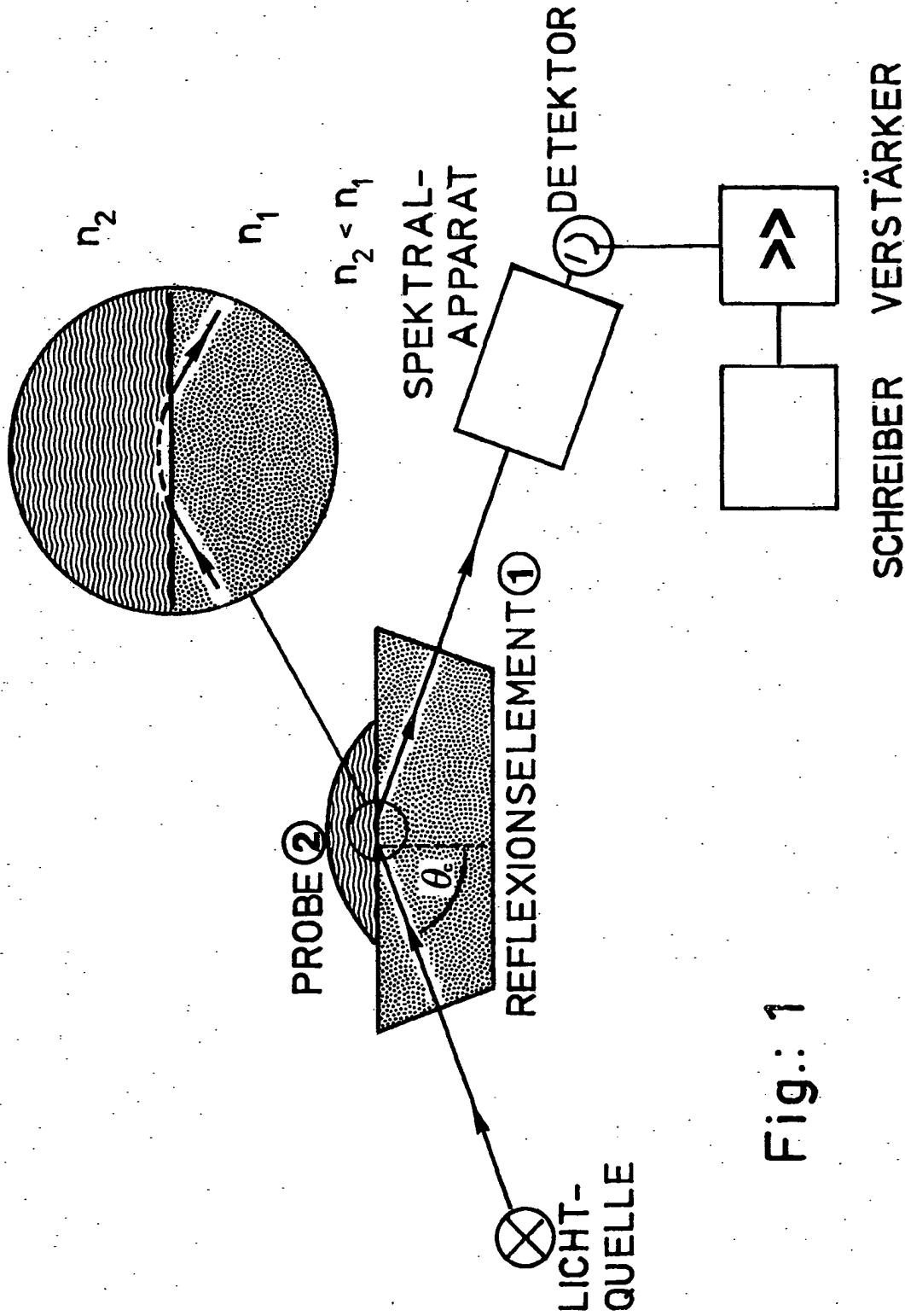


Fig.: 1

030010/0465

2837769

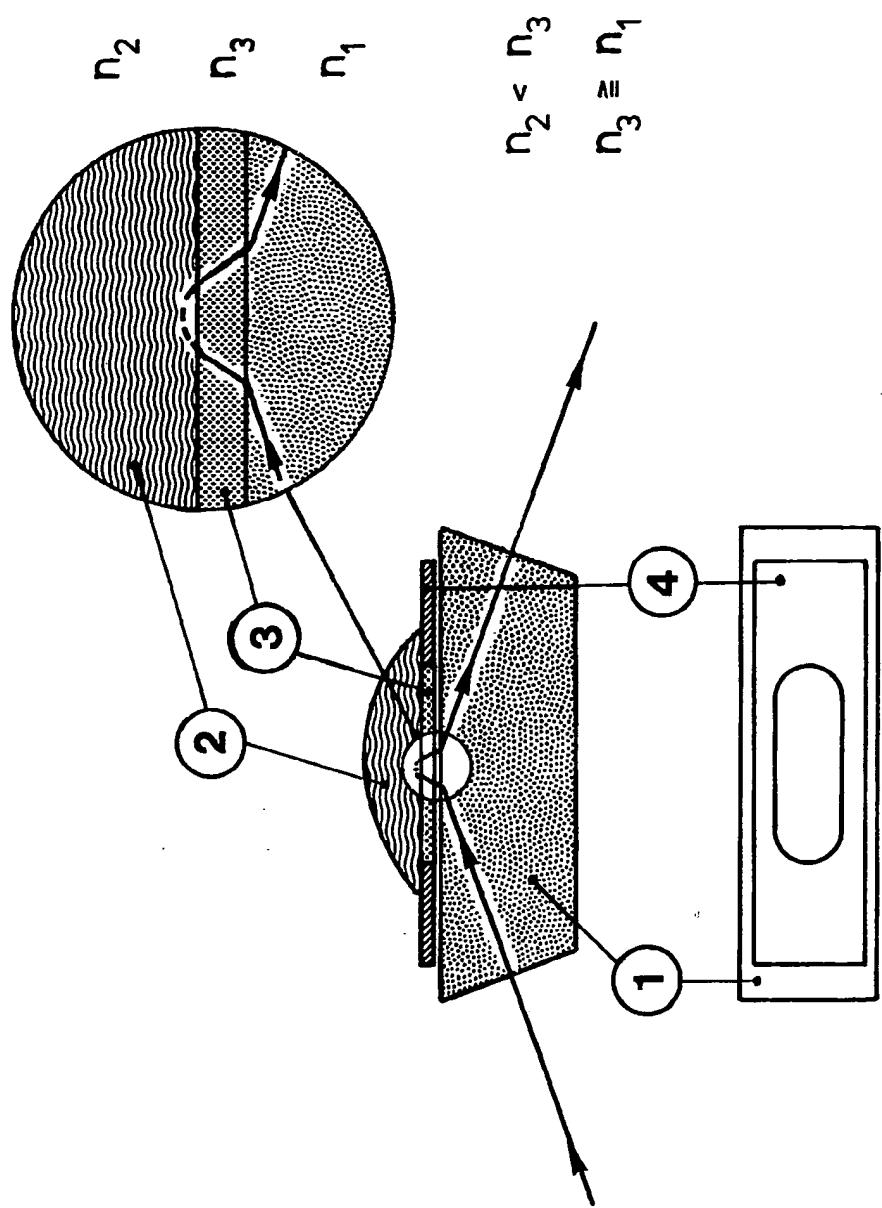


Fig.: 2

030010/0465

- 9.

2837769

$$n_2 < n_5$$
$$n_1 = n_6 = n_5$$

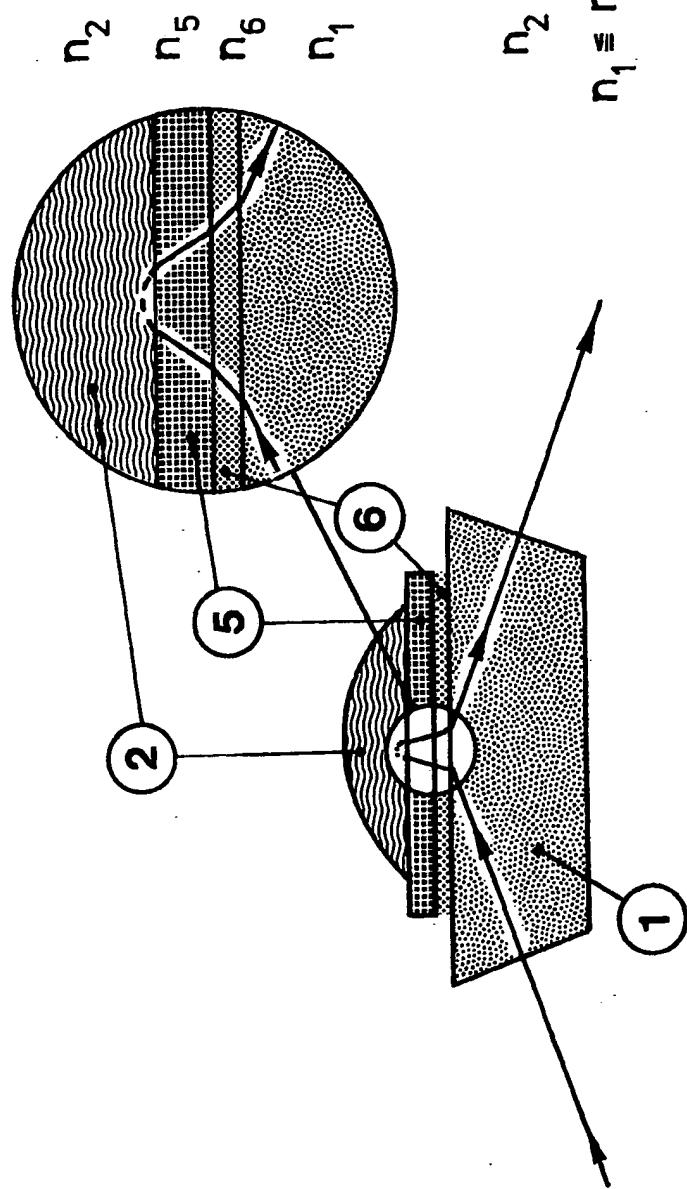


Fig.: 3

030010/0466

• 10.

2837769

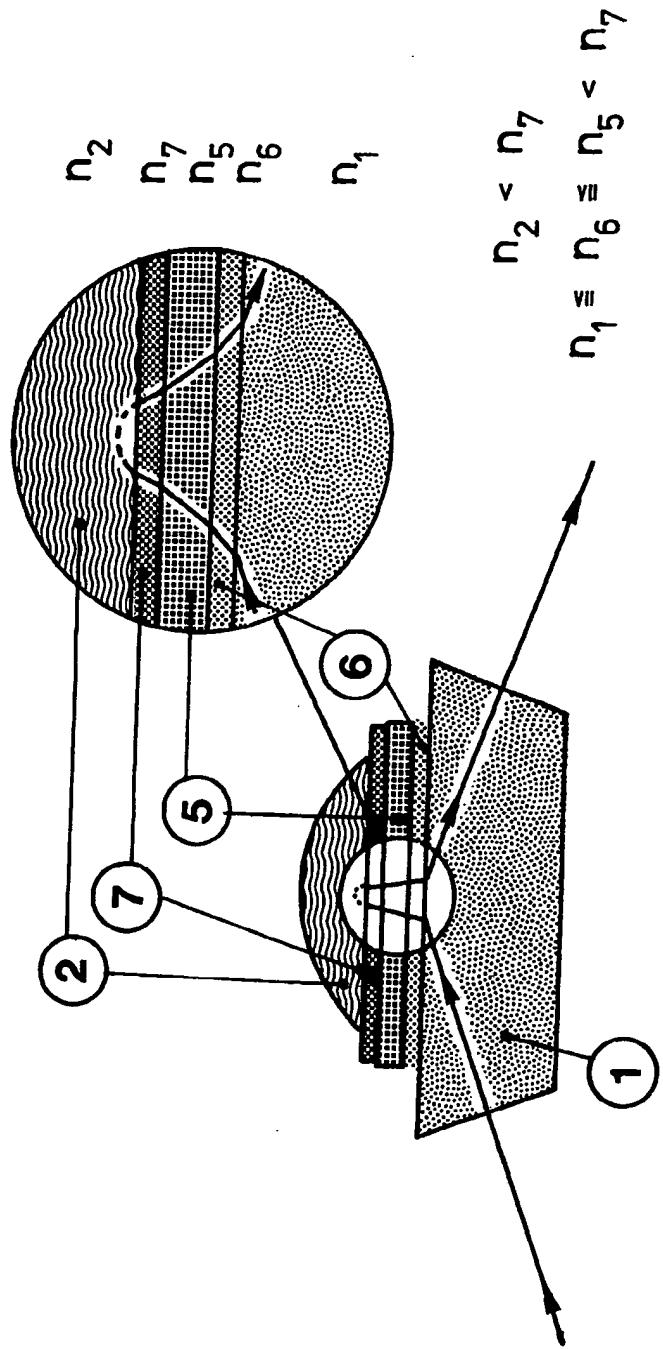


Fig.: 4

030010/0465

L1: Entry 1 of 1

File: DWPI

Mar 6, 1980

DERWENT-ACC-NO: 1980-18692C

DERWENT-WEEK: 198011

COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Biological substance concentration spectroscopy - by internal total reflection on high refractivity layer

INVENTOR: MULLER, G

PRIORITY-DATA: 1978DE-2837769 (August 30, 1978), 1979DE-2928419 (July 13, 1979)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
DE 2837769 A	March 6, 1980	N/A	000	N/A
DE 2837769 C	September 29, 1983	N/A	000	N/A

INT-CL (IPC): G01N 21/48; G01N 33/16

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 2837769A

BASIC-ABSTRACT:

The concn. of biological substances in multi-component systems is determined by a spectroscopic recording of the total internal reflection in an ultraviolet and visible range of the spectrum. To regenerate an optically clean surface of the reflection element, a transparent solid or liquid substance with a high refractive index is inserted as an intermediate layer between reflection element and sample.

This removes the difficulty of absorption of the biomolecules on the surfaces and enables reproducible measurements to be carried out.

✓L13 ANSWER 154 OF 194 CA COPYRIGHT 2001 ACS

AN 93:3433 CA

TI Determination of the concentration of biological substances in multicomponent systems using internal total reflection in the UV and visible spectral ranges

IN Mueller, Gerhard

PA Fed. Rep. Ger.

SO Ger. Offen., 12 pp.

PI DE 2837769 A1 19800306 DE 1978-2837769 19780830

PRAI DE 1978-2837769 19780830

AB A glass plate is coated with a very thin layer of a highly refractive liq. such as the immersion oils Br<sub>4</sub>(CH)<sub>2</sub> and C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>Br, polyvinylcarbazole or other polymer, a resin, etc., or with a solid polymer on which a layer of ZnS, TiO<sub>2</sub>, etc. may be deposited. A sample of lower refraction is placed on the exchangeable coating, and UV or visible light is admitted to the sample through the glass and the coating. The attenuated total reflection in the sample alters the spectral compn. of the incident light which is recorded as a change in the absorption spectrum.